

REVENDICATIONS

5 1) Procédé de création d'au moins une séquence polynucléotidique recombinée caractérisé en ce qu'il comprend une étape de ligation orientée de fragments issus d'une banque d'au moins deux séquences polynucléotidiques.

10 2) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la fragmentation d'une banque de séquences polynucléotidiques ,

b) la dénaturation des fragments ainsi obtenus,

15 c) l'hybridation de fragments obtenus à l'étape (b) avec une ou plusieurs matrice(s) d'assemblage,

d) la ligation orientée desdits fragments pour obtenir au moins une séquence polynucléotidique recombinée,

20 3) Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend après l'étape (d) :

e) la sélection des séquences polynucléotidiques recombinées présentant des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes à une ou plusieurs séquences de référence.

25 4) Procédé selon la revendication 1 à 3 caractérisé en ce que la banque de séquences polynucléotidiques contient des séquences polynucléotidiques double brin

30 5) Procédé selon la revendication 1 à 3 caractérisé en ce que la banque de séquences

polynucléotidiques contient des séquences
polynucléotidiques simple brin

5 6) Procédé selon la revendication 2 à 5
caractérisé en ce que au moins une matrice d'assemblage est
double brin et qu'elle est préalablement dénaturée pour
être ajoutée sous forme simple brin à l'étape (c).

10 7) Procédé selon la revendication 2 à 5
caractérisé en ce que au moins une matrice d'assemblage est
simple brin

15 8) Procédé selon les revendications 2 à 7
caractérisé en ce qu'il comprend à l'issue de l'étape (d)
au moins une répétition des étapes (a), (b), (c) et (d).

20 9) Procédé selon les revendications 2 à 7
caractérisé en ce qu'il comprend à l'issue de l'étape (d)
au moins une répétition des étapes (b), (c) et (d).

25 10) Procédé selon les revendications 3 à 7
caractérisé en ce qu'il comprend à l'issue de l'étape (e)
le choix d'au moins une séquence polynucléotidique
recombinée pour effectuer au moins une répétition des
étapes (a), (b), (c), (d) et (e).

30 11) Procédé selon l'une des revendications 2 à
10 , caractérisé en ce qu'il comprend la séparation des
séquences polynucléotidiques recombinaées de la ou des
matrice(s) d'assemblage avant l'étape (e).

12) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend l'amplification des séquences polynucléotidiques recombinées avant l'étape (e).

5

13) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 12, caractérisé en ce qu'il comprend avant l'étape (e), le clonage de séquences polynucléotidiques recombinées éventuellement après
10 séparation des brins recombinés de la ou des matrices.

14) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisé en ce que les extrémités des fragments générés à l'étape (a) sont telles qu'il
15 puisse y avoir hybridation adjacente de ces extrémités sur au moins une matrice d'assemblage à l'étape (c) et ligation de ces fragments les uns avec les autres à l'étape (d).

15) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 14, caractérisé en ce que les étapes (c) et (d) sont réalisées simultanément.
20

16) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15, caractérisé en ce que l'étape (a) consiste à soumettre les séquences polynucléotidiques de la
25 banque initiale à une hydrolyse par l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction.

17) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 caractérisé en ce que la fragmentation aléatoire des séquences polynucléotidiques à
30

l'étape (a) se fait par tout moyen enzymatique ou mécanique connu.

18) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13 et 15 à 17, caractérisé en ce que l'on ajoute à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) des enzymes capables de reconnaître et dégrader et/ou couper de manière spécifique les extrémités non hybridées des fragments, lorsque lesdites extrémités recouvrent d'autres fragments hybridés sur la même matrice.

19) Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'on ajoute à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) l'enzyme Flap endonucléase.

20) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 caractérisé en ce que l'on ajoute à l'étape (c) et ou (d) au moins une exonucléase spécifique du simple brin capable de reconnaître et dégrader de manière spécifique les extrémités non hybridées des fragments, lorsque lesdites extrémités recouvrent d'autres fragments hybridés sur la même matrice.

21) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on utilise à l'étape (d) une ligase active à haute température et de préférence thermostable.

22) Procédé selon les revendications 18 et 19, caractérisé en ce que les endonucléases capables de reconnaître et de dégrader et/ou couper de manière spécifique les extrémités non hybridées des fragments

ajoutées à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) ont les mêmes propriétés de thermorésistance et d'activité à haute température que la ligase utilisée à l'étape (d).

23) Procédé selon la revendications 20, caractérisé en ce que les exonucléases capables de reconnaître et de dégrader de manière spécifique les extrémités non hybridées des fragments ajoutées à l'étape (c) et/ou à l'étape (d) ont les mêmes propriétés de thermorésistance et d'activité à haute température que la ligase utilisée à l'étape (d).

24) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la banque initiale de séquences polynucléotidiques est générée à partir d'un gène sauvage par étapes de mutagenèse dirigée successives, par PCR error prone, par mutagenèse aléatoire chimique, par mutagenèse aléatoire *in vivo*, ou en combinant des gènes de familles proches ou distinctes au sein de la même espèce ou d'espèces différentes de façon à disposer d'une variété de séquences polynucléotidiques dans la banque initiale.

25) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 23, caractérisé en ce que la banque initiale de séquences polynucléotidiques est constituée de séquences synthétiques qui seront fragmentées à l'étape (a) ou qui peuvent constituer les fragments de l'étape (a)

26) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 16 et 18 à 25 caractérisé en ce que l'étape (a) consiste à soumettre la banque initiale à une

hydrolyse par l'action d'enzymes de restriction ayant un grand nombre de sites de coupure sur les séquences polynucléotidiques de la banque initiale, ou en combinant plusieurs enzymes de restriction.

5

27) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 et 17 à 25 caractérisé en ce que l'étape (a) consiste en un traitement aléatoire avec la DNase I d'une banque initiale de séquences polynucléotidiques .

10

28) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 15 et 17 à 27 caractérisé en ce que l'on utilise des fragments générés par un traitement de façon aléatoire comme matrices les uns pour les autres, pour l'hybridation au cours de l'étape (c) ou de la réaction des étapes (c) et (d) simultanées.

15

29) Procédé selon la revendication 2 à 16 et 18 à 26, caractérisé en ce que l'on utilise les fragments obtenus à l'étape (a) par un traitement avec des enzymes de restriction comme matrices les uns pour les autres, pour l'hybridation au cours de l'étape (c) ou de la réaction de des étapes (c) et (d) simultanées.

20

25

30) Procédé selon la revendication 2 à 15 et 18 à 26, caractérisé en ce que les fragments de l'étape (a) sont obtenus par des réactions d'amplification menées sur les séquences polynucléotidiques de la banque initiale en utilisant des oligonucléotides amorces permettant de générer des fragments ayant des séquences communes, lesdits

30

fragments servant de matrice d'assemblage les uns pour les autres à l'étape (b) ou à l'étape (c).

31) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que à l'étape (a) la banque initiale est fragmentée en n fragments, n étant supérieur ou égal à trois.

32) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on ajoute à l'étape (b) ou (c) en plus de la matrice, des oligonucléotides, simple ou double brin, de longueur variable.

33) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, avant l'étape (e), on sépare les séquences polynucléotidiques recombinaées de la matrice d'assemblage grâce à un marqueur présent sur la matrice d'assemblage ou sur les séquences polynucléotidiques recombinaées.

34) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les séquences polynucléotidiques recombinaées obtenues à l'étape (d) et éventuellement clonées sont criblées par tout moyen approprié pour sélectionner les séquences polynucléotidiques recombinaées ou les clones présentant des propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence.

35) Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le criblage se fait par expression in vitro des séquences polynucléotidiques recombinées

5 36) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la banque de séquences polynucléotidiques initiale est constituée par une ou plusieurs banques restreintes préparées par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 35, éventuellement mélangées avec d'autres séquences polynucléotidiques.

10 37) Une séquence polynucléotidique recombinée présentant une ou plusieurs propriétés avantageuses par rapport aux propriétés correspondantes de séquences de référence, obtenue et sélectionnée par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 36, ladite séquence ayant une taille supérieure à 1,5 Kpb.

15 20 38) Un vecteur contenant une séquence polynucléotidique selon la revendication 37.

25 39) Un hôte cellulaire transformé par une séquence polynucléotidique recombinée selon la revendication 37 ou par un vecteur selon la revendication 38.

30 40) Une protéine codée par une séquence polynucléotidique recombinée selon la revendication 37.

41) Une banque constituée de séquences polynucléotidiques recombinées selon la revendication 37,

ou de vecteur selon la revendication 38, ou d'hôtes cellulaires selon la revendication 39, ou de protéines selon la revendication 40.